体外法研究 pH 与脂多糖或组胺的交互作用对奶山羊瘤胃上皮细胞紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

孙燕勇[1]　高　民[2]　徐　明[1]　宋利文[2]　李　洋[1]　李　超[1]　陈利青[1]　胡红莲[2*]

（1.内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018；2.内蒙古农牧业科学院动物营养与饲料研究所，呼和浩特 010031）

摘　要：本试验旨在采用体外法研究 pH 与脂多糖（LPS）或组胺（HIS）的交互作用对奶山羊瘤胃上皮细胞紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响。选用 8 只体况良好,体重、泌乳量相近的萨能奶山羊作为瘤胃上皮供体。采用 3×3 双因素试验设计，山羊屠宰后采集瘤胃上皮，插入到尤斯灌流仪器（Ussing chamber）半室中央，在浆膜侧半室加入 5 mL 缓冲液，黏膜侧加入配制好的不同处理的培养液 5 mL，每个处理 3 个重复。试验 1，因素 1 为 pH，分别为 7.4、5.5、5.2；因素 2 为 LPS 浓度，分别为 0、30、60 kEU/mL LPS。试验 2，因素 1 为 pH，分别为 7.4、5.5、5.2；因素 2 为 HIS 浓度，分别为 0、0.5、10.0 ng/mL HIS。采集培养 80 min 后的瘤胃上皮，测定其紧密连接蛋白 Claudin-1、Claudin-4、Claudin-7、Occludin、Zonula occludens-1（*ZO*-1）mRNA 表达量。结果显示：1)pH 与 LPS 的交互作用对 Claudin-1、Claudin-7、*ZO*-1 mRNA 表达量影响显著（$P<0.05$）。表现为与 pH 7.4×0 kEU/mL LPS 组相比，降低 pH 或添加 LPS 均显著降低了 Claudin-1、Claudin-7 mRNA 表达量（$P<0.05$），*ZO*-1 mRNA 表达量有整体降低的趋势，但在 pH 5.2×60 kEU/mL LPS 时最高。2）pH 与 HIS 的交互作用对 Claudin-1、Claudin-7、*ZO*-1 mRNA 表达量影响显著（$P<0.05$）。pH 5.5×0.5 ng/mL HIS 组 Claudin-1 mRNA 表达量最低，但与 pH 5.2×0.5 ng/mL HIS 组差异不显著（$P>0.05$）。pH 7.4×10.0 ng/mL HIS 组 Claudin-7 mRNA 表达量显著低于 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组（$P<0.05$），但与 pH 5.5×10.0 ng/mL HIS 组差异不显著（$P>0.05$）。与 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组相比，降低 pH 或添加 LPS 有提高 *ZO*-1 mRNA 表达量的趋势，且 pH 5.2×10.0 ng/mL HIS 组显著提高（$P<0.05$）。结果提示，亚急性瘤胃酸中毒（SARA）发生后，pH 与 LPS 或 HIS 交互作用于

收稿日期：2017-11-07

基金项目：国家自然科学基金项目（31472124，31101739）；内蒙古自然科学基金项目（2015MS0380）；杨胜先生门生社群项目（B2016011）；现代农业（奶牛）产业技术体系建设专项资金（CARS-36）；2016 年度内蒙古自治区青年创新人才项目

作者简介：孙燕勇（1988-），女，河北张家口人，硕士研究生，从事反刍动物营养研究。E-mail: 840353512@qq.com

*通信作者：胡红莲，研究员，E-mail： honglianhu2010@163.com

瘤胃上皮，降低瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量，进而增大瘤胃上皮黏膜通透性。

关键词：亚急性瘤胃酸中毒；奶山羊；瘤胃上皮；组胺；脂多糖；尤斯灌流仪器；紧密连接蛋白

中图分类号：S826

反刍动物瘤胃上皮为多层鳞片状（stratified squamous epithelium，SSE），从黏膜层到浆膜层依次为角质层（stratum corneum，SC）、颗粒层（stratum granulosum，SG）、棘突层（stratum spinosum，SS）和基底层（stratum basale，SB）[1]，颗粒层细胞间存在紧密连接（tight junction，TJ），紧密连接是维持黏膜屏障的重要结构[2]。瘤胃上皮不仅为瘤胃微生物附着、生长提供有利环境，也是动物机体营养物质消化吸收、转运代谢的主要场所。在集约化养殖的今天，反刍动物极易发生亚急性瘤胃酸中毒（SARA），发病后瘤胃渗透压升高、瘤胃内产生大量的有害物质或不稳定环境因素[脂多糖（lipopolysaccharides，LPS）[1]、组胺（histamine，HIS）[2]、高 pH[3]等]，这些有害物质被血液吸收，损伤紧密连接结构，直接导致上皮屏障功能被破坏，从而干扰了瘤胃上皮对营养物质的吸收，及对毒害物质的抵御功能[4]。可见，紧密连接结构的完整是保证瘤胃健康的前提。以往对紧密连接的研究多集中在医学领域。有报道显示人为的烧伤小鼠后，烧伤部位上皮的紧密连接功能失调，细胞间紧密连接受损，形成细胞间隙，破坏上皮通透性[2]。也有研究报道称，肠道上皮细胞紧密连接蛋白 Zonula occludens-1（*ZO*-1）、Occludin、Claudin 等能与骨架肌动蛋白相互作用，可能在肠上皮屏障功能损害的发生中起到重要作用[5]。从 20 世纪 50 年代初 Ussing 等[6]提出将尤斯灌流仪器(Ussing chamber) 运用到上皮组织离子转运开始，相继有学者将该技术拓展到反刍动物瘤胃上皮通透性的研究中[7]。瘤胃上皮通透性的改变可准确反映瘤胃上皮的损伤程度，其通透性增加表明上皮完整性被破坏，屏障功能受损。Klenvenhusen 等[8]采用 Ussing chamber 系统研究得出高精粗比饲粮下山羊瘤胃上皮的通透性显著增加。随后，杨淑青[11]通过递增饲粮非纤维性碳水化合物/中性洗涤纤维（NFC/NDF）诱导奶山羊发生 SARA，结果测得瘤胃上皮紧密连接蛋白 Claudin-1、*ZO*-1 和 Occludin mRNA 表达量显著降低；同时该研究还采用 Ussing chamber 测定瘤胃上皮的通透性，发现 SARA 显著升高了瘤胃上皮的短路电流（short-circuit current，Isc）、组织导电性（tissue conductance，Gt），表明瘤胃上皮通透性增加。程萌[12]在此基础上，增大了 NFC/NDF 范围进一步诱导 SARA，结果 SARA 组瘤胃上皮紧密连接蛋白 Claudin-4

mRNA 表达量显著升高。间隙连接（gap junction，GJ）蛋白 Connexin-43、桥粒芯蛋白 Desmoglein-1 mRNA 表达量显著降低，同时，该团队不仅测得 SARA 显著降低瘤胃内 pH，还增加了瘤胃内和血浆中的异常代谢产物（LPS、HIS 等）含量。以上研究表明，反刍动物发生 SARA 后，瘤胃内环境紊乱，进一步降低了瘤胃内 pH，同时，LPS、HIS 都表现出显著增加[9-10]，瘤胃上皮细胞紧密连接蛋白 mRNA 的表达量改变，使瘤胃上皮细胞间隙向着增大的方向改变，破坏了瘤胃上皮的完整性增加通透性。而这些异常代谢产物究竟是如何影响瘤胃上皮通透性的，是单因素 pH，抑或是多因素 pH 与 LPS 或 HIS 共同作用的结果，有待深入研究。为此，本试验采用 Ussing chamber 在体外研究 pH 与 LPS 或 HIS 对奶山羊瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的交互影响，从分子层面揭示 pH 与 LPS 或 HIS 对影响奶山羊瘤胃上皮通透性的机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物与饲养管理

选用 8 只体况良好、体重(43.58±2.77) kg、泌乳量相近的经产萨能奶山羊为试验动物，饲养在内蒙古农牧业科学院动物试验基地。试验动物采取单笼饲养，每天 06：00 和 18：00 等量饲喂。自由饮水，试验期 30 d。

1.2 基础饲粮

基础饲粮参照美国 NRC（2007）[11]，并结合国内《奶山羊饲养标准》[12]配制，为以玉米、豆粕、麦麸、苜蓿、青干草为主要原料设计的 NFC/NDF 为 1.40 的饲粮。基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1 基础饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table1 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
苜蓿 Alfalfa	30.72
青干草 Green hay	18.57
玉米 Corn	37.88
豆粕 Soybean meal	1.47
麸皮 Wheat bran	8.20
食盐 NaCl	0.46
石粉 Limestone	0.19
预混料 Premix1)	2.51

合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
泌乳净能 NE_L/（MJ/kg）	7.12
粗蛋白质 CP	12.45
非纤维性碳水化合物 NFC	44.45
中性洗涤纤维 NDF	31.78
酸性洗涤纤维 ADF	21.33
钙 Ca	0.54
磷 P	0.32
钙磷比 Ca to P ratio	1.68
精粗比 Concentrate to forage ratio	51:49

[1)]每千克预混料含有 One kilogram of premix contained the following：$MnSO_4·5H_2O$ 1560 mg，$FeSO_4·7H_2O$ 6240 mg，$ZnSO_4·7H_2O$ 3500 mg，KI 17 mg，$NaSeO_3$130 mg，$CoCl_2·6H_2O$ 206 mg，$CuSO_4·5H_2O$ 300 mg，VA 1620 000 IU，VD_3 324 000 IU，VE 540 IU，VB_{12} 0.9 mg，VB_5 450 mg，VK_3 150 mg，叶酸 folic acid 15 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 750 mg。

[2)] 粗蛋白质、中性洗涤纤维、钙、磷为实测值，其余为计算值。非纤维性碳水化合物(%)=1-中性洗涤纤维-粗蛋白质-粗脂肪-粗灰分。CP，NDF，Ca and P were measured values, while the others were calculated values. NFC(%)=1-NDF-CP-EE-Ash。

1.3 试验设计

本试验采用 3×3 双因素试验设计。向 Ussing chamber（6 通道）黏膜侧添加配制好的不同处理的缓冲液，试验 1，因子 1 为 pH，设 7.4（对照）、5.5、5.2 3 个水平，因子 2 为 LPS 浓度，分别为 0、30、60 kEU/mL；试验 2，因子 1 为 pH，设 7.4（对照）、5.5、5.2 3 个水平，因子 2 为 HIS 浓度，分别为 0、0.5、10.0 ng/mL。试验共 15 个组（2 项试验 pH 为 7.4、未添加 LPS 或 HIS 的组共用），每组 3 个重复，每屠宰 1 只羊得到的瘤胃上皮用于 2 组试验。Ussing chamber 培养时长为 80 min（前 20 min 为平衡期）。pH、HIS 和 LPS 浓度的设置是根据本课题组前期研究结果与国内外相关研究结论[3,12,13-14]。

1.4 主要仪器与试剂

Ussing chamber 系统（EM-CSYS-4，PI 公司，美国）、电泳仪（BG-Power600，北京百晶生物技术有限公司）、高速冷冻离心机（1730R，耐士科技有限公司）、PCR 仪[毅新兴业（北京）科技有限公司]、实时定量 PCR 仪（Illuminer 公司,美国）、凝胶成像仪（Snap Gene 公司，美国）、漩涡振荡器（ST-T256，其林贝尔仪器制造有限公司）、酶标仪（Bio Tek 公司，

美国）、掌上离心机（CX-200，国华电器有限公司）、酶标仪（MultiSkan 3，Thermo 公司,美国）、低温冷冻离心机（Fresco，Thermo 公司,美国）、电泳槽（Mini P-4，北京凯元信瑞仪器有限公司）、电泳仪（Bio-Rad 公司,美国）、电动组织匀浆器（Fluka 公司，德国）、湿转电泳槽（北京凯元信瑞仪器有限公司）。

Ussing chamber 系统缓冲液、3 mol/LKCl 溶液、琼脂、KH_2PO_4-$NaHPO_4$ 缓冲液、H_2O_2 溶液、3,3′,5,5′-四甲基联苯胺溶液（TMB）、LPS、HIS、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸。

1.5 试验方法

1.5.1 瘤胃上皮采集与处理

首先安装好 Ussing chamber 半室和夹片，按顺序分别安装电压电极和电流电极。之后在 Ussing chamber 系统每个半室中加入 5 mL 预热的缓冲液，通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体，点开软件运行系统，平衡大约 10 min 并且待电脑显示曲线稳定后，进行试验动物屠宰，打开腹腔立即采集新鲜的瘤胃腹囊上皮组织 2 cm×3cm，用预热好的缓冲液反复冲洗干净，将瘤胃上皮样品迅速剥离肌层后剪成 1 cm×1 cm，将固定环夹片取下后固定样品（黏膜侧朝左），插入到 Ussing chamber 半室中央。分别在浆膜侧半室加入 5 mL 缓冲液，黏膜侧加入配制好的不同组的培养液 5 mL，每组 3 个重复。瘤胃上皮经过 80 min 的培养后，使用消毒的镊子夹入无菌无酶的冻存管中，立刻放于液氮中，随后转入-80 ℃冰箱冻存待测瘤胃上皮紧密连接蛋白 Claudin-1、Claudin-4、Claudin-7、Occludin、*ZO*-1 mRNA 表达量。

1.5.2 缓冲液及不同培养液的配制

Ussing chamber 缓冲液的配制参照 Klenvenhusen 等[10]和程萌[12]，具体成分如下：NaCl 80.00 mmol/L，KCl 5.00 mmol/L，$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.40 mmol/L，$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 2.40 mmol/L，$C_3H_5NaO_2$ 10.00 mmol/L，$C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ 25.00 mmol/L，$C_4H_7NaO_2$ 5.00 mmol/L，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.20 mmol/L，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.20 mmol/L，$NaHCO_3$ 25.00 mmol/L。将配制好的缓冲液置于 4 ℃保存。

调整培养液 pH 所用试剂添加量见表 2。按表中添加量在缓冲液中添加，配制不同 pH 的缓冲液。按照试验设计的添加量添加 LPS 或 HIS。

表 2 调整培养液 pH 所用试剂添加量

Table 3 Supplemental levels of agents adjusting pH of culture medium mmol/L

项目 Items	pH		
	7.4	5.5	5.2

乙酸 Acetic acid	30	60	90
丙酸 Propionic acid	30	60	90
丁酸 Butyric acid	10	20	30
乳酸 Lactic acid	0.5	1.0	1.5

1.5.3 电极的制备

Ussing chamber 电极套管结构如图 1 所示。先称取 2 g 琼脂放于 50 mL 离心管内，加入 3 mol/L KCl 溶液 50 mL，放入 100 ℃水浴锅中静止加热直至离心管中液体成透明黏稠状，无气泡后取出。用 5 mL 注射器吸取适量 KCl-琼脂溶液，向电极套管尖部注射 0.5～1.0 cm 的 KCl-琼脂。选出电极套管中 KCl-琼脂部分无气泡并且长度适宜的备用，并将制作好的电极套管存放于 3 mol/L KCl 溶液中。

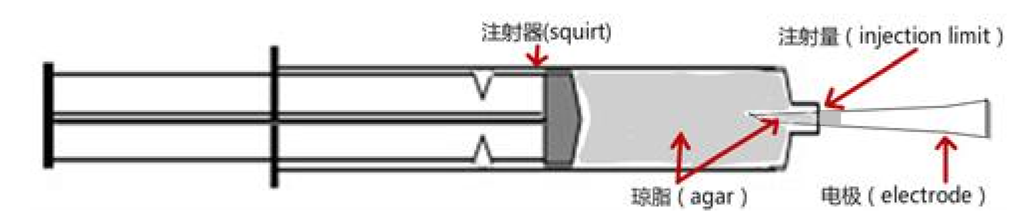


图 1 尤斯灌流仪器电极套管结构

Fig.1 Structure ofelectrode casing of Ussing chamber

1.6 瘤胃上皮细胞紧密连接基因 mRNA 表达量测定

1.6.1 提取总 RNA 及反转录

取冻存的奶山羊瘤胃上皮组织 50～100 mg 放入已装满液氮的研钵中研磨成粉末，将粉末移至 1.5 mL 离心管中。参照 RNAprep Pure Tissue Kit 说明书提取总 RNA，并用酶标仪测总 RNA 浓度，用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 样品质量。将总 RNA 参照 TIANScript RT Kit 说明书进行反转录。最后把反转录所得 cDNA 产物放入冰箱-20 ℃保存备用。

1.6.2 PCR 引物设计及合成

根据 GenBank 中相应的 cDNA 序列，用 Primer Premier 5.0 软件设计实时定量 PCR（RT-PCR）扩增特异性引物，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。引物参数见表 3。

表 3 RT-PCR 引物参数

Table 3 Parameters of primers for RT-PCR

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Sequences of primer（5′-3′）	产物长度 Product length/bp
β肌动蛋白	NM_001009784	F:GGCAGGTCATCACCATCGG	158

β-actin		R:CGTGTTGGCGTAGAGGTCTTT	
Claudin-4	XM_005697785.1	F:CAGCAAGGAGGAATGGAAAGA R: GCAGGGAGGATTGAAGAAGG	186
Claudin-1	HM_117762.1	F:CACCCTTGGCATGAAGTGTA R:AGCCAATGAAGAGAGCCTGA	132
Claudin-7	XM_013972136.1	F:GACGGGAGGCATCATTTTCA R:CAGAGTTGGGCTTAGGGTAGGA	260
Occludin	XM_004016906.1	F:GTGGTAACTTGGAGACGCTTTC R:CTCCCGTCGTGTAGTCTGTT	105
ZO-1	XM_004018080.1	F:TTGAACGCAAGTTTGAAAGTCC R:TCTTCATCTTCATCCTCCTCCAC	262

F：正向引物 forward primer；R：反向引物 reverse primer。

1.6.3 实时实时定量 PCR

本试验用SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)（天根生化科技公司）进行实时定量PCR扩增。PCR反应体系（20 μL）如下：2×SuperReal PreMix Plus 10.00 μL，正向引物(10 μmol/L)0.60 μL，反向引物(10 μmol/L)0.60 μL，cDNA模板2.00 μL，RNase-free ddH_2O 6.80 μL。

经反复试验优化后得到的反映程序如下:1）预变性，95 ℃30 s。2）PCR反应，95℃10 s，60 ℃30 s，72 ℃30 s，40次循环。3）溶解曲线分析，95 ℃15 s，60 ℃15 s，95 ℃15 s。在扩增完成后分析各个基因的熔解曲线，来确保RT-PCR产物的专一性，操作重复3次。最后，将β肌动蛋白（β-actin）设为内参使用$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算基因mRNA的表达量。

1.7 数据统计

采用 SAS 8.0 对所有数据进行分析，采用 MIXED 程序进行双因素方差分析，差异显著的采用 Duncan 氏法进行多重比较，混合模型包括主效应 LPS、HIS、pH，pH 与 LPS 互作效应，pH 与 HIS 的互作效应。$P<0.05$ 为差异显著判断标准，$P>0.05$ 为差异不显著判断标准。

2 结 果

2.1 总 RNA 质量

将提取完毕的瘤胃上皮总 RNA 经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 2 所示，18 S 和 28S 条带清晰，经酶标仪检测 260 nm 吸光度值/280 nm 吸光度值（$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$）在 1.8~2.2，没有蛋白质和 DNA 的污染，总 RNA 质量完好。

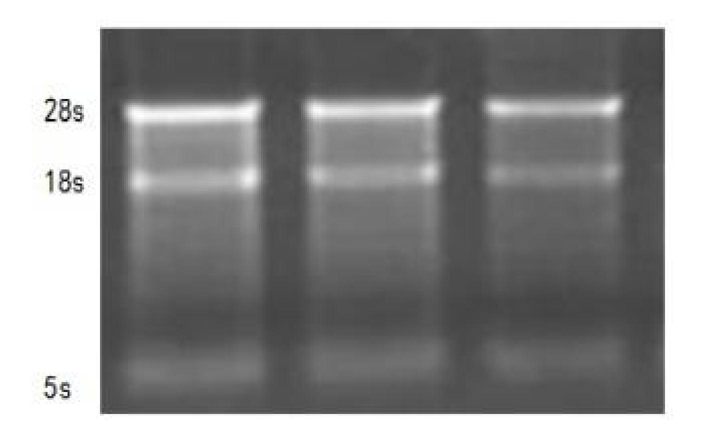


图 2 奶山羊瘤胃上皮总 RNA 电泳图

Fig.2 Electrophotogram of total RNA of rumen epithelium of dairy goats

2.2 紧密连接蛋白基因的 PCR 扩增和克隆测序

β-actin、Claudin-1、Claudin-4、Claudin-7、Occludin 与 *ZO*-1 的 PCR 扩增产物分别在 158、186、132 和 89 bp 处呈现 1 条特异性条带，对其进行纯化、克隆和菌液 PCR 鉴定后，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，将测序所得序列同 GenBank 中登录号为 NM_001009784、XM_005697785.1、HM_117762.1、XM_013972136.1、XM_004016906.1 和 XM_004018080.1 的基因进行对比，同源性为 100%。

2.3 pH 和 LPS 对瘤胃上皮紧密连接蛋白基因 mRNA 表达量的影响

如表 4 所示，以 LPS 为主效应时，60 kEU/mL LPS 组 Claudin-7 mRNA 表达量显著高于 30 kEU/mL LPS 组（$P<0.05$），这 2 组均显著低于 0 kEU/mL LPS 组（$P<0.05$）；60 kEU/mL LPS 组 *ZO*-1 mRNA 表达量与 0、30 kEU/mL LPS 组相比显著升高（$P<0.05$）；60 kEU/mL LPS 组 Occludin mRNA 表达量与 0、30 kEU/mL LPS 组相比，显著降低（$P<0.05$）。

以 pH 为主效应时，pH 5.2 组 Claudin-1、Claudin-7 与 *ZO*-1 mRNA 表达量显著高于 pH 7.4 组（$P<0.05$）。与 pH 7.4 组相比，pH 5.5 组 Claudin-7 mRNA 表达量显著升高（$P<0.05$）。

pH 与 LPS 的交互作用对 Claudin-1、Claudin-7、ZO-1 mRNA 表达量影响显著（$P<0.05$）。多重比较发现：与 pH 7.4×0 kEU/mL LPS 组相比，降低 pH 或添加 LPS 均显著降低了 Claudin-1、Claudin-7 mRNA 表达量（$P<0.05$）。*ZO*-1 mRNA 表达量变化趋势不规律，在 pH5.2×60 kEU/mL LPS 组最高，显著高于 pH 7.4×0 kEU/mL LPS 组（$P<0.05$）。

表 4 pH 和 LPS 对奶山羊瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

Table 4 Effects of pH and LPS on mRNA expression levels of TJ proteins in ruminal epithelium of dairy goats

脂多糖 LPS/(kEU/mL)	pH	Claudin-1	Claudin-4	Claudin-7	Occludin	*ZO*-1
0	7.4	6.28^{a}	1.35	8.98^{a}	2.54	0.21^{ab}
	5.5	1.21^{b}	0.35	0.73^{c}	5.33	0.01^{c}
	5.2	0.17^{c}	0.17	5.87^{b}	4.37	0.21^{ab}
30	7.4	0.26^{c}	0.17	0.04^{c}	4.38	0.06^{c}
	5.5	0.03^{c}	0.24	0.04^{c}	4.40	0.28^{ab}
	5.2	0.06^{c}	0.34	0.22^{c}	4.21	0.01^{c}
60	7.4	0.04^{c}	3.83	0.02^{c}	1.75	0.81^{b}
	5.5	0.05^{c}	0.55	2.51^{c}	3.07	0.19^{c}
	5.2	1.01^{b}	2.96	2.60^{c}	2.59	1.86^{a}
SEM		0.252	1.644	0.746	0.818	0.423
主效应 Main effects						
脂多糖 LPS/(kEU/mL)	0	2.55^{a}	0.62	5.19^{a}	4.08^{a}	0.14^{b}
	30	0.12^{b}	0.25	0.10^{c}	4.33^{a}	0.12^{b}
	60	0.37^{b}	2.45	1.59^{b}	2.47^{b}	0.96^{a}
pH	7.4	0.15^{b}	2.00	0.03^{b}	3.07	0.44^{b}
	5.5	0.04^{b}	0.39	1.10^{a}	3.73	0.24^{b}
	5.2	0.53^{a}	1.66	1.41^{a}	3.40	0.94^{a}
P 值 *P*-value	pH	0.030	0.605	0.020	0.612	0.016
	脂多糖 LPS	0.094	0.196	0.001	0.005	0.000
	pH×脂多糖 pH×LPS	0.010	0.599	0.033	0.598	0.002

同一项目、同列数据不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。下表同。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference（*P*<0.05）. The same as below.

2.4 pH 和 HIS 对瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

如表 5 所示，以 HIS 为主效应时，0.5 ng/mL HIS 组 Claudin-1、Claudin-7 mRNA 表达量显著低于 0、10.0 ng/mL HIS 组（*P*<0.05）；10.0 ng/mL HIS 组 *ZO*-1 mRNA 表达量显著高于 0、0.5 ng/mL HIS 组（*P*<0.05），0.5 ng/mL HIS 组显著高于 0 ng/mL HIS 组（*P*<0.05）。

以 pH 为主效应时，与 pH 7.4 组相比，pH 5.2 组和 pH 5.5 组 Claudin-1 mRNA 表达量均显著降低（*P*<0.05），pH 5.2 组最低（*P*<0.05）；pH 5.2 组和 pH 5.5 组 Claudin-7 mRNA 表达量显著升高（*P*<0.05），pH 5.5 组最高；pH 5.5 组 *ZO*-1 mRNA 表达量显著低于 pH 5.2 组和 pH 7.4 组（*P*<0.05），pH 5.2 组显著高于 pH 5.5 组和 pH 7.4 组（*P*<0.05）。

pH 与 HIS 的交互作用对 Claudin-1、Claudin-7 与 *ZO*-1 mRNA 表达量有显著影响（*P*<0.05）。多重比较发现：与 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组相比，降低 pH 或添加 HIS 均显著降低了 Claudin-1 mRNA 表达量（*P*<0.05），pH 7.4×10.0 ng/mL HIS 组最低。pH 5.5×10.0 ng/mL HIS 组 Claudin-7

mRNA 表达量最低，显著低于 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组（$P<0.05$）。与 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组相比，降低 pH 或添加 HIS 整体上提高了 *ZO*-1 mRNA 表达量，pH 5.2×10.0 ng/mL HIS 组最高，显著高于其他各组（$P<0.05$）。

表 5　pH 和 HIS 对奶山羊瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

Table 5　Effects of pH and HIS on mRNA expression levels of TJ proteins in ruminal epithelium of dairy goats

组胺 HIS/(ng/mL)	pH	Claudin-1	Claudin-4	Claudin-7	Occludin	*ZO*-1
	7.4	6.28^{a}	1.35	8.98^{b}	2.54	0.21^{de}
0	5.5	1.21^{c}	0.35	0.73^{d}	5.33	0.01^{e}
	5.2	0.17^{c}	0.17	5.87^{c}	4.37	0.21^{de}
	7.4	2.60^{b}	2.07	1.20^{d}	3.65	1.97^{b}
0.5	5.5	0.06^{c}	6.87	16.60^{a}	4.20	0.40^{cd}
	5.2	0.26^{c}	4.36	2.25^{d}	3.82	0.17^{de}
	7.4	0.11^{c}	0.64	0.77^{d}	3.78	0.74^{c}
10.0	5.5	0.56^{c}	3.59	0.23^{d}	3.07	0.43^{cd}
	5.2	0.14^{c}	2.12	6.38^{bc}	2.40	4.01^{a}
SEM		0.609	2.004	3.428	0.956	1.403
主效应 Main effects						
	0	2.55^{a}	0.62	5.19^{a}	4.08	0.14^{c}
组胺 HIS	0.5	0.97^{a}	4.13	6.95^{a}	3.89	0.85^{b}
	10.0	0.27^{b}	2.12	2.46^{b}	3.08	1.73^{a}
	7.4	1.36^{a}	1.35	1.38^{c}	3.71	1.36^{b}
pH	5.5	0.31^{b}	4.90	8.41^{a}	3.63	0.42^{c}
	5.2	0.20^{b}	3.24	4.32^{b}	3.11	2.09^{a}
	pH	0.012	0.285	<0.001	0.459	<0.001
P 值 *P*-value	组胺 HIS	0.030	0.216	<0.001	0.077	<0.001
	pH×组胺 pH×HIS	0.003	0.912	<0.001	0.305	<0.001

3　讨　论

3.1　pH 对瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

瘤胃上皮的细胞连接主要分为紧密连接、桥粒连接（desmosome junction，DJ）、黏着连接（adhesion junction，AJ）和间隙连接，而紧密连接是细胞间最重要的连接方式。瘤胃中的紧密连接位于颗粒层细胞之间，是维持瘤胃黏膜屏障的重要结构基础，是决定细胞间通透性大小的主要因素。紧密连接作为动态的通透性屏障，具有双重功能，不仅能够阻止潜在的有害物质或病原体入侵瘤胃上皮，维持瘤胃上皮的完整性，还可以允许营养物质、离子和水的出入，保证了瘤胃上皮的通透性。紧密连接这种特殊的生理功能在胃肠道黏膜屏障的维护中起着举足轻重的作用。但病理状态下，紧密连接若被破坏，细胞间隙就会增大，细菌与毒

素等大分子物质便趁机移位，黏膜的选择性屏障作用丧失。当紧密连接发生变异、减少或缺失时，紧密连接再分配和基因表达就会下调，使上皮细胞受损、萎缩，屏障功能下降，细胞间紧密连接被破坏，进而使上皮细胞通透性增加[15]。但是从分子水平研究影响瘤胃上皮屏障功能的相关机制的报道甚少，有学者提出瘤胃上皮中存在的紧密连接膜内蛋白有Claudin-1、Claudin-4、Claudin-7 和 Occludin，GJ 蛋白有 Connexin-43 及桥粒芯蛋白 Desmoglein-1。采用免疫印迹定位发现 Claudin-1、ZO-1 和 Connexin-43 存在于瘤胃黏膜颗粒层，从颗粒层到棘突层和基底层逐渐减少[16]。

瘤胃酸中毒根据 pH 的大小和持续时间长短分为急性瘤胃酸中毒和 SARA。通常认为 pH<5.5 并超过 3h 即为 SARA，而 pH<5.2 基本判定为急性酸中毒[20]。pH 是瘤胃内一项重要的生理指标，可以反映瘤胃发酵生理。但是对瘤胃发生 SARA 的临界 pH 仍然说法不一，有学者提出瘤胃内 pH5.5～5.8 属于正常生理状态，但是 pH 5.0~(<5.5)则属于 SARA 状态，pH 在 5.2～5.5 属于中度酸中毒[21]。近年来常以 pH5.2 作为衡量急性酸中毒的临界值，以 pH 低于 5.5 持续 3h 以上判定为 SARA 发生的标志。

本试验中 pH 是参照国内外研究结果设定为 7.4、5.5、5.2。由结果看出，随着 pH 的降低，Claudin-1、Claudin-4 mRNA 表达量下调，与王娟[22]研究结果相似。Claudin-7 mRNA 在 pH 5.5 时表达量最低，可能说明 pH 5.5 时瘤胃上皮紧密连接功能部分受到破坏，所以 pH 5.5 作为公认的 SARA 界定标准比较合理，而当 pH 为 5.2 时，Claudin-1、Claudin-4 mRNA 表达量下调可能说明发生了急性酸中毒。此时对瘤胃上皮紧密连接的破坏程度加深。Occludin 随 pH 降低表现上调趋势，但变化不显著。这与王娟[22]的报道不同，即 Occludin mRNA 的表达量主要受到 pH 的影响并且随 pH 降低而降低。可能是由于培养方式不同所致，Ussing chamber 的环境是模拟瘤胃环境，为保证短时间内瘤胃上皮组织不失活。而多数学者是采用培养瘤胃上皮细胞为研究对象[23-24]。

3.2　pH 和 LPS 对瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

研究表明，饲粮 NFC/NDF 增加后，血浆 LPS 浓度升高，并引发奶山羊内毒素血症[25]。也有资料显示，高谷物诱导反刍动物发生 SARA 时往往会伴随血浆或者瘤胃液中 LPS 浓度的增加[26]。本课题组研究发现，饲粮 NFC/NDF 由 1.40 增加到 3.23 时，血浆中 LPS 浓度也逐渐增加，由 15.76×10^3 EU/mL 显著增加到 85.55×10^3 EU/mL，与前人报道[13]相符。Chin 等

[27]对小肠上皮细胞研究发现，随着 LPS 浓度的增加会一氧化氮（NO）的生成增加，减少 ZO-1，改变紧密连接蛋白的结构和功能。此外，本课题组前期研究是体外通过 Ussing chamber 测定 pH 与 HIS 或 LPS 组合后，研究瘤胃上皮的电生理参数的变化，进而得出对于瘤胃上皮通透性，pH 与 HIS 或 LPS 的交互作用大于单因素 pH、HIS 或 LPS 浓度[23]。结合以上试验结果，探索损伤瘤胃上皮紧密连接的分子机制。

本试验结果看出，这些紧密连接蛋白 mRNA 表达量有很大变化。pH 与 LPS 处理对瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 的表达量的影响有所不同，其中以 LPS 为主效应时，60 kEU/mL LPS 的添加降低了 Claudin-7 mRNA 表达量，增加了 *ZO*-1 mRNA 表达量，降低了 Occludin mRNA 表达量。以 pH 为主效应，与 pH 7.4 相比，pH 5.2 显著增加了 Claudin-1、Claudin-7、*ZO*-1 mRNA 表达量显著增加。pH 与 LPS 的交互作用降低了 Claudin-1、Claudin-7 mRNA 表达量，且随着 pH 的降低和 LPS 浓度的升高而呈现作用增强趋势。

王娟[22]采用体外培养的瘤胃上皮细胞，通过设定培养液不同 pH 与短链脂肪酸（SCFA）浓度组合处理，发现对瘤胃上皮细胞 Occludin mRNA 表达量与对照组比无显著差异；SCFA 的添加显著下调 *ZO*-1 mRNA 表达量。但 SCFA 的添加和低 pH（pH<6.8）均显著上调 Claudin-1 和 Claudin-4 mRNA 表达量。当反刍动物发生 SARA 后，瘤胃内 SCFA 浓度增加，进一步降低了瘤胃内 pH，可见 pH 与 SCFA 能够影响瘤胃上皮细胞紧密连接蛋白的表达。刘军花[20]试验发现，高谷物饲粮显著降低了 Cladudin-4、Occludin 和 *ZO*-1 mRNA 表达量。而本研究采用不同浓度的 SCFA 来配制的 3 个梯度的 pH，在 Ussing chamber 中培养后测得 *ZO*-1 mRNA 表达量随 pH 降低而先降低后升高。通过以上研究可以看出，在短期内将瘤胃上皮置于不同 pH 的体外瘤胃模拟环境中，与正常 pH 相比，降低 pH 下调了紧密连接蛋白 Claudin-1 mRNA 表达量，综合来看，且在 pH 5.5 处理下，对瘤胃上皮通透性的影响最严重。

3.3 pH 和 HIS 对瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

HIS 是重要的生物活性物质之一，也是 I 型变态反应的重要介质，参与变态反应、过敏反应、血管收缩和舒张；同时也是炎症反应和免疫损伤的重要介质。当发生 SARA 时，瘤胃内环境发生紊乱，瘤胃内长期处于低 pH 状态，组氨酸脱羧形成 HIS，异常代谢产物 HIS 等增多[24]，造成瘤胃黏膜损伤，破坏了瘤胃屏障功能。反刍动物瘤胃上皮的屏障功能对维护瘤胃吸收、消化和代谢功能非常关键，上皮细胞可以通过细胞间隙的紧密连接蛋白调控小

分子电中性溶质和离子被动扩散。因此，紧密连接的健康是实现屏障功能所必需的[28]。程萌[12]的研究表明，当山羊瘤胃发生 SARA 时，其通透性发生改变，与对照组相比，SARA 组瘤胃上皮紧密连接 Claudin-4 mRNA 的表达量显著升高，且比对照组升高了 38.61%。本研究对山羊瘤胃上皮紧密连接蛋白 Claudin-1、Claudin-4、Claudin-7、Occludin 和 *ZO*-1 mRNA 表达量进行研究。加入 HIS 后，瘤胃上皮紧密连接蛋白 Claudin-1 mRNA 表达量下调，而随 HIS 浓度增加，Claudin-4 mRNA 表达量先升高后降低。pH 5.5 时的 Claudin-1 mRNA 表达量与 pH 5.2 时差异不显著。Claudin-7 mRNA 表达量有降低趋势，且在 pH 5.5×10.0 ng/mL HIS 处显著低于其他组。各组 Occludin mRNA 表达量无显著差异。。这与杨淑青[11]的研究不完全一致，杨淑青[11]指出发生 SARA 后紧密连接蛋白 Occludin、*ZO*-1 mRNA 表达量显著降低，分别下降了 51.3%和 51.8%，这一研究的方法是诱导奶山羊发生 SARA 后屠宰，采集新鲜的瘤胃上皮样本测定紧密连接蛋白 mRNA 表达量，而本研究是在 Ussing chamber 内短期模拟诱导，这可能是造成差异的原因。

郭鹏等[29]指出血液中 HIS 含量随饲粮 NFC/NDF 增加而表现增加趋势。Aschenbach 等[4]调查显示，HIS 诱导细胞凋亡，或增加细胞脱落，或干涉细胞核分裂和细胞成熟，这些变化意味着在 SARA 过程中异常代谢产物 HIS 能干扰上皮细胞的再生，进而造成细胞损伤，引发炎症反应。而在本试验结果看出，pH 与 HIS 交互作用对瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 的表达量的影响有所不同。降低 pH 或添加 HIS 均能显著降低瘤胃上皮 Claudin-1、Claudin-7 mRNA 表达量。以 HIS 为主效应，添加 10.0 ng/mL HIS 的 *ZO*-1 mRNA 表达量显著高于添加 0.5 ng/mL HIS，而这 2 者均显著高于不添加 HIS；以 pH 为主效应，与 pH 7.4 相比，pH 5.5 和 pH 5.2 时的 Claudin-1 mRNA 表达量均显著降低，并且在 pH 5.2 时达最低。Claudin-7 mRNA 表达量有降低趋势。pH 与 HIS 的交互作用对 Claudin-1、Claudin-7 与 *ZO*-1 mRNA 表达量有显著影响。pH 5.5×0.5 ng/mL HIS 组 Claudin-1 mRNA 表达量最低，但与 pH 5.2×0.5 ng/mL HIS 组差异不显著，pH 7.4×10.0 ng/mL HIS 组 Claudin-7 mRNA 显著低于 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组，但与 pH 5.5×10.0 ng/mL HIS 组差异不显著。与 pH 7.4×0 ng/mL HIS 组相比，降低 pH 或添加 HIS 整体上提高了 *ZO*-1 mRNA 表达量，且 pH 5.2×10.0 ng/mL HIS 组时显著高于其他组。以上研究可见，瘤胃内 pH 与 HIS 的交互影响下，显著降低了部分紧密连接蛋白基因 mRNA 表达量，破坏瘤胃上皮结构与功能，是引起 SARA 的主要诱因之一。

4 结　论

SARA 发生后，pH 与 LPS 或 HIS 交互作用于瘤胃上皮，降低瘤胃上皮紧密连接蛋白 mRNA 表达量，进而增大瘤胃上皮黏膜通透性。

[1] HARHA N S,ANTONETTI D A.Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2004,36(7):1206–1237.

[2] STEELE M A,CROOM J,KAHLER M,et al.Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptation during grain-induced subacute ruminal acidosis[J].American Journal of Physiology-Regulatory,Integrative and Comparative Physiology,2011,300(6):R1515–R1523.

[3] EMMANUEL D G V,MADSEN K L,CHURCHILL T A,et al.Acidosis and lipopolysaccharide from *Escherichia coli* B:055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues[J].Journal of Dairy Science,2007,90(12):5552–5557.

[4] ASCHENBACH J R,FÜRLL B,GÄBEL G.Histamine affects growth og sheep ruminal epithelial cells kept in primary culture[J].Zentralblatt Fur Veterinarmdizin Reihe A,1998,45(6/7):411–416.

[5] PENNER G B,TANIGUCHI M,GUAN L L,et al.Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue[J].Journal of Dairy Science,2009,92(6):2767–2781.

[6] PLAIZIER J C,KRAUSE D O,GOZHO G N,et al.Subacute ruminal acidosis in dairy cows:thephysiological causes,incidence and consequences[J].The Veterinary Journal,2008,176(1):21–31.

[7] 何雯.缺氧对 LIMK1 介导的 cofilin 磷酸化的影响及其在肠上皮屏障功能损害中的作用研究[D].硕士学位论文.重庆:第三军医大学,2015.

[8] USSING H H,ZERAHN K.Active transport of sodium as the source of electric current in the short－circuited isolated frog skin[J].Acta physiologica Scandinavica,1951,23(2/3):110–127.

[9] 杨淑青,胡红莲,欧阳效晴,等.瘤胃上皮机械屏障的评定方法[J].中国畜牧兽

医,2014,41(1):136–140.
[10] KLENVENHUSEN F,HOLLMANN M,PODSTATZKY-LICHTENSTEIN L,et al.Feeding barley grain-rich diets altered electrophysiological properties and permeability of the ruminal wall in a goat model[J].Journal of Dairy Science,2013,96(4):2293–2302.
[11] 杨淑青.亚急性瘤胃酸中毒对奶山羊瘤胃上皮屏障功能影响机制的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.
[12] 程萌.亚急性瘤胃酸中毒对奶山羊瘤胃上皮通透性及细胞连接蛋白表达的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2016.
[13] 孙燕勇,胡红莲,高民,等.亚急性瘤胃酸中毒对奶山羊血浆异常代谢产物及生化指标的影响[J].动物营养学报,2017,29(3):1046–1055.
[14] 章森.不同日粮模式对奶牛血浆内毒素、代谢产物和激素含量的影响[D].硕士学位论文.重庆:西南大学,2013.
[15] NUTRITION N R C SOG.Nutrient requirements of goats:angora,dairy,and meat goats in temperate and tropical countries[M].Washington,DC:National Academy Press,1989.
[16] 金公亮.奶山羊饲养标准[J].畜牧兽医杂志,1989,8(2):7–12.
[17] KHAFIPOUR E,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation[J].Journal of Dairy Science,2009,92(4):1712–1724.
[18] 胡红莲,卢德勋,刘大程,等.日粮不同 NFC/NDF 比对奶山羊瘤胃 pH、挥发性脂肪酸及乳酸含量的影响[J].动物营养学报,2010,22(3):595–601.
[19] ASCHENBACH JR,GABEL G.Effect and absorption of histamine in sheep rumen:significance of acidotic epithelial damage[J].Journal of Animal Science,2000,78(2):464–470.
[20] 刘军花.亚急性瘤胃酸中毒对山羊瘤胃上皮屏障功能的影响及其机制[D].博士学位论文.南京:南京农业大学,2014.
[21] KOERS W C,BRITTON R,KLOPFENSTEIN T J,et al.Ruminal histamine,lactate and animal performance[J].Journal of Animal Science,1976,43(3):684–691.

[22] 王娟.不同精粗比日粮对奶牛和山羊瘤胃上皮屏障的影响[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2012.

[23] 孙燕勇.亚急性瘤胃酸中毒对奶山羊瘤胃上皮通透性的影响及其机制研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2017.

[24] 胡红莲.奶山羊亚急性瘤胃酸中毒营养生理机制的研究[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.

[25] 赵培厅.日粮不同NFC/NDF比对奶山羊瘤胃发酵功能和微生物区系变化的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.

[26] GOZHO G N,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2007,90(2):856–866.

[27] CHIN A C,FLYNN A N,FEDWICH J P,et al.The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions[J].Canadian Journal of Physiology and Pharmacology,2006,84(10):1043–1050.

[28] RADOSTITS O M,BLOOD D C,GAY C C.Diseases of the alimentary tract-Ⅱ[M]//RADOSTITS O M,BLOOD D C,GAY C C.Veterinary medicine:a textbook of the diseases of cattle,sheep,pigs,goats and horses.8th ed.London:Baillière Tindall,1994.

[29] 郭鹏,刘大程,赵培厅,等.不同 NFC/NDF 比日粮对奶山羊瘤胃细菌及瘤胃和血浆中内毒素及组胺含量的影响[J].畜牧兽医学报,2015,46(1):96－103.

Interaction Effects of pH and Lipopolysaccharide or Histamine on mRNA Expression Levels of Tight Junction Proteins of Rumen Epithelium of Dairy Goats *in Vitro*

SUN Yanyong[1] GAO Min[2] XU Ming[1] SONG Liwen[2] LI Chao[1] LI Yang[1] CHEN Liqing[1] HU Honglian[2*]

(1. *College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China*; 2. *Research Institute of Animal Nutrition, Inner Mongolia Academy of Animal Sciences, Hohhot* 010030, *China*)

Abstract: The objective of this study was to investigate the interaction effects of pH and lipopolysaccharide （LPS） or histamine (HIS) on mRNA expression levels of tight junction proteins of rumen epithelium of dairy goats *in vitro*. Eight healthy Saanen dairy goats with similar body weight and milk yield were used as the donors of rumen epithelium. A 3×3 two-factor experiment design was adopted. After slaughtering, rumen epithelium was collected and inserted in the middle of half chamber in a Ussing chamber. Buffer at 5 mL was added to the serosal side, and different treatments of culture mediums at 5 mL were added to the mucosal side, each treatment had 3 replicates. Experiment 1, factor 1 was pH, and was 7.4, 5.5, 5.2, respectively; factor 2 was LPS concentration, and was 0, 30 and 60 kEU/mL, respectively. In experiment 2, factor 1 was pH, and was 7.4, 5.5, 5.2, respectively; factor 2 was HIS concentration, and was 0, 0.5 and 10 ng/mL, respectively. The rumen epithelium was collected after cultured for 80 min, and the expression levels of Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7, Occluding and Zonula occludens-1

(*ZO*-1) mRNAs were measured. The results showed as follows: 1) The interaction between pH and LPS had significant effects on expression levels of Claudin-1, Claudin-7 and *ZO*-1 mRNAs (P<0.05). Compared with pH 7.4×0 kEU/mL LPS group, the decrease of pH or the supplementation of LPS significantly decreased expression levels of Claudin-1 and Claudin-7 mRNAs (P<0.05), and tended to rise expression level of *ZO*-1 mRNA, while it was the highest in pH 5.2×60 kEU/mL LPS group. 2) The interaction between pH and HIS had significant effects on expression levels of Claudin-1, Claudin-7 and *ZO*-1 mRNAs (P<0.05). pH 5.5×0.5 ng/mL HIS group had the lowest expression level of Claudin-1 mRNA, which was not significantly different from that in pH 5.2×0.5 ng/mL HIS group（P>0.05）. Compared with pH 7.4×0 ng/mL HIS group, pH 7.4×10.0 ng/mL HIS group had significantly lower expression level of Claudin-7 mRNA, which was not significantly different from that in pH 5.5×10.0 ng/mL HISgroup （P>0.05）. Compared with pH 7.4×0 kEU/mL LPS group, the decrease of pH or the supplementation of HIS tended to rise expression level of *ZO*-1 mRNA, and that in pH 5.2×10.0 ng/mL HIS group was significantly increased（P<0.05）. The results suggest that after subacute rumen acidosis（SARA）occurs, pH interacts with LPS or HIS to decrease the expression levels of tight junction proteins in the rumen epithelium, which in turn increases the permeability of rumen epithelial mucosa.

Key words: subacute rumen acidosis; dairy goats; rumen epithelium; histamine; lipopolysaccharides; Ussing chamber; tight junction proteins

*Corresponding author, researcher, E-mail: honglianhu2010@163.com （责任编辑 王智航）